

ISOLASI BAKTERI PENDEGRADASI SENYAWA PERSISTEN ORGANIC POLLUTANTS ASAL TANAH INCEPTISOL KARAWANG

S. Wahyuni¹, A.N. Ardiwinata¹, I. M. Sudiana²

¹Balai Penelitian Lingkungan Pertanian

²Laboratorium Mikrobiologi LIPI Cibinong

E-mail: swahuni@gmail.com

ABSTRAK

Penggunaan pestisida yang tidak terkontrol akan mengganggu agroekosistem pertanian dan mencemari lingkungan. Jumlah pestisida yang beredar di Indonesia tahun 2006 terdaftar sebanyak 1336 formulasi, 2008 sebanyak 1702 formulasi, 2010 sebanyak 2048 formulasi, 2011 sebanyak 2247 formulasi. Di dalam tanah, karbon aktif berperan sebagai *shelter* atau rumah untuk mikroorganisme. Pori-pori kecil pada karbon aktif digunakan sebagai tempat tinggal bakteri, sedangkan pori besar dan retakan (*cracks*) digunakan sebagai tempat berkumpul. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong Mei 2011 s/d Agustus 2011. Tujuan penelitian adalah menyeleksi bakteri dalam tanah yang berpotensi mendegradasi residu insektisida yang bersifat *persistent organic pollutants* (POPs). Isolasi dan karakterisasi mikroba pendegradasi POPs dilakukan dengan tiga tahapan, yaitu (1) Isolasi dan identifikasi mikroba pendegradasi POPs, (2) Uji karakteristik pertumbuhan isolat pada berbagai jenis POPs, dan (3) Penetapan residu insektisida POPs hasil kultur. Hasil terdapat 7 (tujuh) isolat yang mampu mendegradasi senyawa POPs, Lima isolat bersifat gram positif (BOB1, BOB2, BOB3, BOB4, BOB5) efektif untuk mendegradasi POPs berbahan aktif: lindan, heptaklor, DDT, dan dieldrin, sedangkan dua isolat bersifat gram negatif (BOB6 dan BOB7) efektif untuk mendegradasi POPs berbahan aktif aldrin.

Kata Kunci: Arang Aktif, Senyawa POPs, Bakteri Pendegradasi

PENDAHULUAN

Penggunaan pestisida mempunyai kontribusi paling besar terhadap peningkatan produksi pertanian sejak tahun 1970. Jumlah pestisida yang beredar di Indonesia dari tahun ke tahun semakin meningkat. Pada tahun 2006 terdaftar sebanyak 1336 formulasi, 2008 jumlah pestisida yang beredar sebanyak 1702 formulasi, 2010 sebanyak 2048 formulasi, atau rata-rata terjadi kenaikan jumlah formulasi sebanyak 13% per tahun (Kompes, 2006; PPI, 2008; PPI 2010, PPI 2011). Di Asia, Indonesia termasuk negara yang banyak menggunakan pestisida setelah Cina dan India (Soerjani, 1990).

Penggunaan pestisida yang tidak terkontrol berakibat agroekologi pertanian dan kesehatan manusia sebagai konsumen menjadi terabaikan. Pengendalian hama sebelum tahun 1997 (program pengendalian hama terpadu, PHT) lebih banyak mengandalkan pestisida jenis organoklorin yang memiliki toksisitas tinggi dan persistensi lama dalam tanah sehingga berpotensi mencemari lingkungan.

Arang aktif tempurung kelapa efektif meningkatkan sifat fisik tanah. Pada tanah berlempung, dapat membantu menurunkan kekerasan tanah dan kemampuan pengikatan air menjadi lebih tinggi. Hal ini akan dapat menciptakan aktivitas mikroorganisme tanah (Ogawa, 1994). Di dalam tanah, karbon aktif berperan sebagai *shelter* atau rumah untuk mikroorganisme. Pori-pori kecil pada karbon aktif digunakan sebagai tempat tinggal bakteri, sedangkan pori besar dan retakan (*cracks*) digunakan sebagai tempat berkumpul (Ogawa, 1994)

Penggunaan arang aktif di lahan sawah dapat meningkatkan jumlah bakteri dan bakteri fiksasi nitrogen non simbiotik (*Azotobacter*) di dalam tanah terutama di sekitar akar tanaman. Hasil penelitian di Jepang menunjukkan bahwa peningkatan frekuensi bakteri fiksasi nitrogen pada lahan yang menggunakan arang aktif terhadap non arang aktif yakni, 10-15% di Hokkaido dan Tohoku (Honshu Utara), 36-48% di Kanto hingga Chugoku (Honshu sebelah Timur-Barat) dan Shikoku, 59-66% di Kyusu (Ogawa, 1994). *Persistent organic pollutants* (POPs) adalah senyawa organik yang tahan terhadap degradasi fotolitik, biologis maupun kimia. POPs biasanya mengandung senyawa



halogen dan mempunyai sifat kelarutan rendah di dalam air, dan kelarutan yang tinggi di dalam lipid. POPs terakumulasi di dalam jaringan lemak. POPs diketahui tahan lama berada di lingkungan dan mempunyai efek jangka panjang terhadap sistem imun, hormon, dan reproduksi manusia. Pestisida jenis organoklorin adalah identik dengan POPs, karena terdapat gugus halogen pada senyawanya. Jenis organoklorin tersebut adalah *aldrin*, *hexachlorobenzene*, *chlordane*, *mirex*, *dieldrin*, *toxaphene*, DDT, *dioxin*, *endrin*, *furans*, *heptachlor* dan PCBs. *United Nations Environment Programme* (UNEP) menaruh prioritas besar pada 12 jenis POPs tersebut untuk diidentifikasi keberadaannya di lingkungan. Hasil penelitian UNESCO (1991) menunjukkan bahwa hampir di semua sampel tanah, air, dan tanaman terdeteksi kandungan residu organoklorin seperti aldrin, dieldrin, DDT, heptaklor dan lindan. Berdasarkan klasifikasi kelas bahaya menurut WHO, disulfoton, Famphur, mevinphos, aldicarb termasuk dalam kategori I (*extremely hazardous*), sedangkan *toxaphene*, *chlordane*, DDT, *heptachlor* dan *lindane* termasuk kategori II (*highly hazardous*). DDT, lindan termasuk *moderate hazardous*.

Tujuan penelitian adalah menseleksi bakteri dalam tanah yang berpotensi mendegradasi residu insektisida yang bersifat *persistent organic pollutants* (POPs).

METODE PENELITIAN

Isolasi dan karakterisasi mikroba pendegradasi POP dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong dengan tiga tahapan, yaitu (1) Isolasi dan identifikasi mikroba pendegradasi POPs, (2) Uji karakteristik pertumbuhan isolat pada berbagai jenis POPs, dan (3) Penetapan residu insektisida POPs hasil kultur. Sebelum dilakukan isolasi mikroba, tanah sumber mikroba potensial pendegradasi POPs di tumbuhkan pada berbagai jenis media cair yaitu:

1. Media mineral + glukosa (1000:1; v/v) tanpa POPs
2. Media mineral + glukosa (1000:1; v/v) dengan 5 ppm POPs (Lindan, Heptachlor, DDT, Eldrin)
3. Media mineral + glukosa (1000:1; v/v) dengan 10 ppm POP
4. Media mineral tanpa POPs
5. Media mineral dengan 5 ppm POPs
6. Media mineral dengan 10 ppm POPs

Tahapan pengkayaan mikroba potensial dilakukan dilakukan sebagai berikut: (1) Timbang 0,5 g tanah dan diencerkan dengan akuades steril sebanyak 9,5 ml, kemudian digoyang pada *rotary shaker* (175 rpm) selama 1 jam pada suhu 28°C, dan dilakukan pengenceran berseri sampai 10⁻³. Pengenceran yang terakhir sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam 4,8 ml masing-masing media cair di atas. Media mineral per liter mengandung: 10 g NaNO₃, 2,5 g NH₄Cl, 2,6 g KH₂PO₄, 7,4 g K₂HPO₄, 1 g MgSO₄·7H₂O, 2 g CaCl₂, 0,01 g CuSO₄, 0,05 g Fe sitrat, 0,1 g EDTA, 10 ml larutan *trace element*, dan media yang mengandung: 10 g NaNO₃, 2,5 g NH₄Cl, 2,6 g KH₂PO₄, 7,4 g K₂HPO₄, 1 g MgSO₄·7H₂O, 2 g CaCl₂, 0,01 g CuSO₄, 0,05 g Fe sitrat, 0,1 g EDTA, 10 ml larutan *trace element* dan 1 gr glukosa. Semua larutan yang digunakan disterilkan. Konsentrasi insektisida campuran dibuat sebagai berikut: 0, 5, dan 10 ppm insektisida POPs. Contoh diinkubasi di bioshaker dengan suhu ruang (± 28°C) selama beberapa hari. Pertumbuhan mikroba diamati dengan menggunakan metode turbidimetri yang diukur pada panjang gelombang 600 nm. Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan kekeruhan pada media. Percobaan pengkayaan dilakukan dengan 3 kali ulangan.

Isolasi dan identifikasi mikroba pendegradasi POPs

Contoh diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung inkubasi berisi 5 ml medium mineral yang mengandung: 10 g NaNO₃, 2,5 g NH₄Cl, 2,6 g KH₂PO₄, 7,4 g K₂HPO₄, 1 g MgSO₄·7H₂O, 2 g CaCl₂, 0,01 g CuSO₄, 0,05 g Fe sitrat, 0,1 g EDTA, dan 1 g glukosa. Semua larutan yang digunakan disterilkan. Konsentrasi insektisida campuran dibuat seri larutan sebagai berikut: 0, 5, dan 10 ppm insektisida POPs. Contoh diinkubasi di bioshaker dengan suhu ruang (± 28°C) selama beberapa hari. Pertumbuhan mikroba diamati dengan menggunakan metode turbidimetri yang diukur pada panjang



gelombang 600 nm. Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan kekeruhan pada media. Percobaan isolasi pengkayaan pertama dilakukan dengan 3 perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali.

Kultur yang tumbuh pada pengkayaan tingkat pertama selanjutnya dipindahkan ke media yang mengandung 5-10 ppm pestisida POPs. Reaksi positif menunjukkan dengan perubahan kekeruhan pada media.

Pengukuran aktivitas total enzim hidrolisis

Pengukuran aktivitas enzim hidrolisis dilakukan pada medium mineral + soil extract (0,5,10 ppm) dan medium mineral + pestisida dengan konsentrasi 0, 5, 10, 20 ppm. Sebanyak 2 ml kultur dari masing-masing perlakuan ditambah dengan 15 ml 60 mM potassium phosphate buffer pH 7.6 dalam 50 ml konikal flask. Kemudian ditambah dengan 0,2 ml 1000 ppm FDA dan blanko yang digunakan adalah akuades. Konikal flask selanjutnya ditutup dan diinkubasi dalam Orbital Incubator, 100 rpm pada suhu 30°C selama 20 menit. Setelah 20 menit reaksi dihentikan dengan penambahan 15 ml kloroform/methanol (2:1 v/v), flask dikocok, dan larutan dipindahkan kedalam 50 ml tabung sentrifus. Larutan tersebut disentrifus pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan larutan difilter dengan whatman paper No. 2, dan filtrat diukur pada panjang gelombang 490 nm. Konsentrasi fluoresein yang dilepaskan selama 20 menit, dihitung dengan kurva kalibrasi (0-5 ppm).

Penetapan residu insektisida POPs

Pengukuran residu insektisida POPs dilakukan pada hasil kultur mikroba pendegradasi residu insektisida POPs 20 hari setelah pembuatan kultur. Analisis residu pestisida POPs dilakukan di Laboratorium Balingtan (Lab. Residu Bahan Agrokimia) di Bogor dengan menggunakan GC Varian Type 450. Konsentrasi residu insektisida POPs dalam contoh dihitung berdasarkan rumus dari Ohsawa *et al* (1985) sebagai berikut :

$$[\text{POPs}] = A \frac{B}{C} \times \frac{D}{E} \times \frac{F}{G} \text{ .ppm}$$

Keterangan:

A = konsentrasi standar ($\mu\text{g/mL}$ larutan),

B = area puncak sampel,

C = area puncak standar,

D = volume larutan standar yang disuntikkan (μL),

E = volume larutan sampel yang disuntikkan (μL),

F = volume ekstrak heksana-eter (mL),

G = volume supernatan (mL),

F/G = faktor pengenceran

[POP]= Konsentrasi POP

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat pendegradasi senyawa POPs

Bakteri pendegradasi pestisida yang berasal dari lahan sawah yang tercemar insektisida POPs diisolasi dengan menggunakan medium *minimal*. Isolat bakteri yang diperoleh dari masing-masing pestisida 1 koloni tunggal sehingga didapatkan total 7 koloni yang mampu tumbuh pada media yang diperkaya dengan senyawa POPs. (lindan, heptaklor, ddt, dieldrin dan aldrin). Hasil pengujian diperoleh dua isolat yaitu Bob 1, dan Bob 2 yang mampu tumbuh dengan baik pada media ekstrak yang ditambahkan Lindan, Heptaklor, DDT, Dieldrin dan Aldrin sekitar 5 ppm. Hasil uji kemampuan degradasi menunjukkan Lindan dan Heptaklor merupakan senyawa pestisida yang paling mudah didegradasi oleh Strain Bob1 dan Bob2 (Tabel 1).

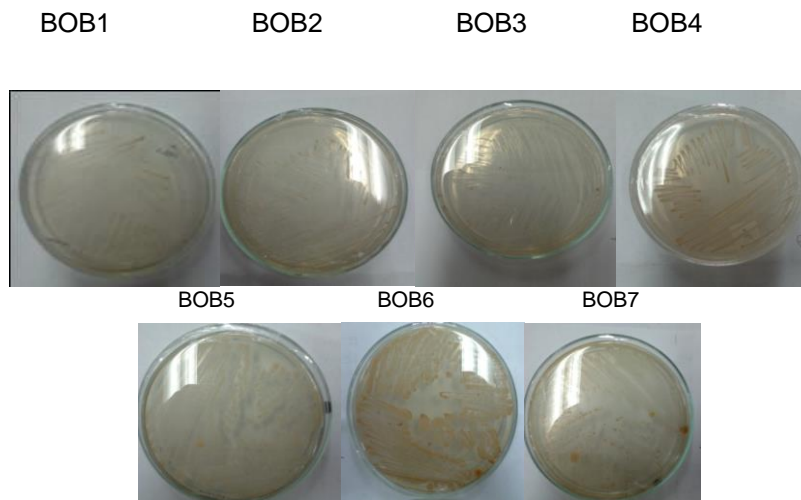
Tabel 1. Perbandingan kemampuan degradasi pestisida oleh beberapa strain yang diisolasi dari tanah



sawah

Strain	Jenis pestisida						Morfologi sel	Motiliti	Kecepatan pertumbuhan
	Lindan	HP T	DDT	Dieldrin	Aldrin	Gram status			
Bob 1	+++	+++	++	+/-	-	+	Batang (1,4-2,1 µm)	motile	Sangat cepat
Bob 2	++	++	+	++	-	+	Batang (1,4-2,1 µm)	motile	Sangat cepat
Bob 3	+	+/-	+	+	-	+	Oval (1,8-1,9 µm)	motile	Moderate
Bob 4	+/-	+/-	+	++	-	+	Oval (1,8-1,9 µm)	motile	Moderate
Bob 5	+	++	+	+++	+	+	Coco-bacil (1,8-1,9 µm)	motile	Sangat cepat
Bob 6	+	+/-	+	+/-	+	-	Coco-bacil (1,8-1,9 µm)	motile	Moderate
Bob 7	-	+/-	+	+/-	+	-	Coco-bacil (1,8-1,9 µm)	motile	Moderate

Berdasarkan kemampuan tumbuh didalam medium yang diberi tambahan insektisida (Lindan, Heptaklor, DDT, dan Dieldrin) pada kosentrasi 5 ppm, ternyata isolat tersebut mampu menggunakan insektisida sebagai sumber karbon (Gambar 1). Setelah 8 hari diinkubasi kedalam medium cair, kemampuan ketujuh isolat tumbuh bervariasi dengan pola pertumbuhan eksponensial (Gambar 2-8). Strain BOB 1 dan BOB 2 memiliki kemampuan pertumbuhan yang sangat cepat dibandingkan dengan strain lainnya dalam mendegradasi POPs. Senyawa dengan atom karbon pendek lebih cepat didegradasi dibandingkan dengan senyawa toksikan rantai karbon panjang.



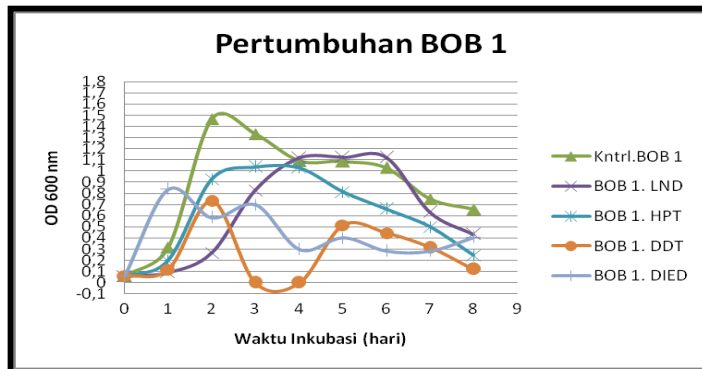
Gambar 1. Isolat bakteri yang berasal dari tanah sawah memiliki 7 strain (BOB1, BOB2, BOB3, BOB4, BOB5, BOB6, dan BOB7).

Pertumbuhan Isolat pendegradasi senyawa POPs

Pola pertumbuhan isolat pada berbagai macam media senyawa POPs dengan konsentrasi 5 ppm yang diinkubasi selama 8 jam yang diamati dengan metode turbidimetri yang diukur pada panjang gelombang 600 nm.

Pertumbuhan Isolat BOB1

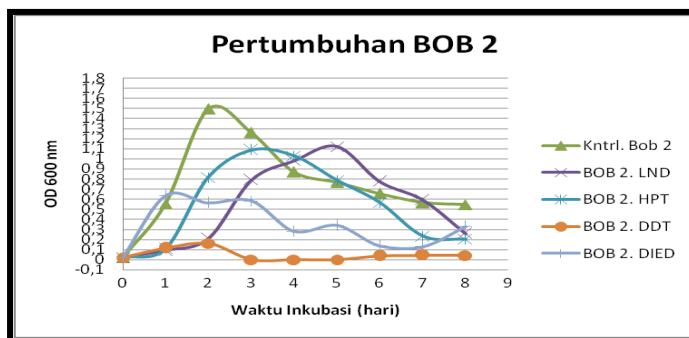
Gambar 2 menunjukkan strain yang potensial mendegradasi POPs. Strain ini mampu menggunakan glukosa dengan baik yang menunjukkan bahwa strain ini bersifat heterotrofik. Kecepatan pertumbuhan optimum tercapai dalam jangka waktu 72 jam. Strain Bob 1 mampu mendegradasi heptaklor dan lindan sebagai sumber karbon. Degradasi lindan dimulai setelah 96 jam, sedangkan heptaklor setelah 48 jam kultivasi. Strain ini juga mampu mendegradasi DDT dan dieldrin, tetapi laju degradasinya lebih lambat dibandingkan dengan heptaklor dan lindan.



Gambar 2. Karakteristik degradasi senyawa Lindan, Heptachlor, DDT dan dieldrin oleh strain Bob 1.

Pertumbuhan Isolat BOB2

Strain Bob 2 merupakan strain heterotrofik yang tumbuh cepat, yang dindikasikan dengan laju degradasi glukosa dengan cepat. Strain ini serupa dengan Bob 1 dapat menggunakan HPT lebih cepat dibandingkan dengan Lindan (Gambar 2) Heptaklor digunakan cepat setelah 48 jam inkubasi, sedangkan Lindan digunakan setelah 72 jam inkubasi. Dapat menggunakan dieldrin akan tetapi DDT toksik terhadap strain ini. Tidak seperti halnya strain Bob1 dan Bob 2, strain mampu tumbuh cepat pada glukosa, akan tetapi Heptaklor dan Lindan dapat digunakan setelah 7 hari waktu inkubasi.

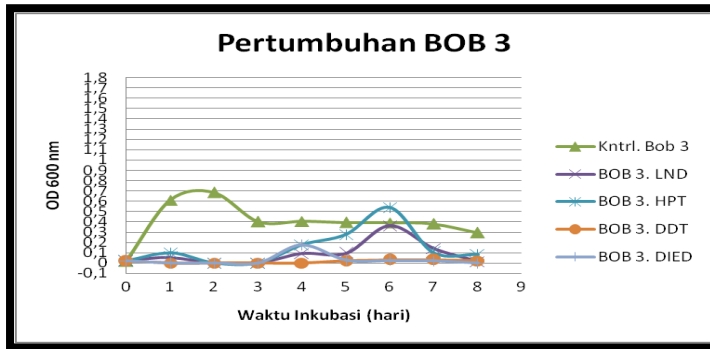


Gambar 3. Karakteristik degradasi senyawa Lindan, Heptachlor, DDT dan dieldrin oleh strain Bob 2.

Pertumbuhan Isolat BOB3

DDT dan dieldrin sangat toksik terhadap strain Bob 3 yang ditunjukkan oleh laju degradasinya yang lambat. Daya degradasi strain BOB 3 terhadap glukosa, heptaklor dan lindan setengah dari kemampuan strain Bob 1 dan Bob 2.

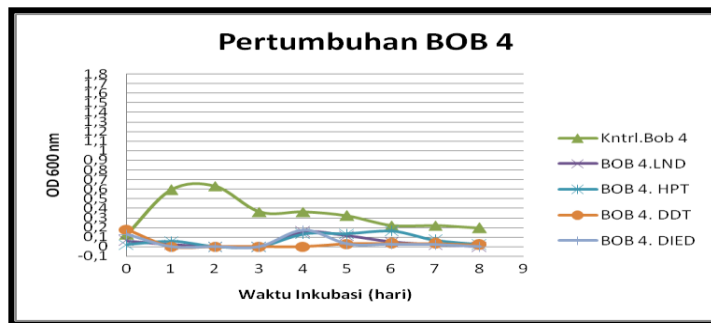




Gambar 4. Karakteristik degradasi senyawa Lindan, Heptachlor, DDT dan dieldrin oleh starin BOB 3.

Pertumbuhan Isolat BOB4

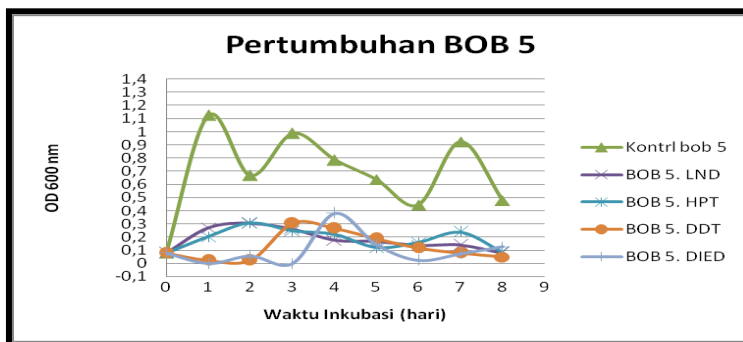
Strain BOB 4, mendegradasi rendah terhadap Heptaklor dan Lindan, diduga DDT dan dieldrin bersifat toksik terhadap strain ini sehingga tidak mampu tumbuh



Gambar 5. Karakteristik degradasi senyawa Lindan, Heptachlor, DDT dan dieldrin oleh starin BOB 4.

Pertumbuhan Isolat BOB5

Strain 5 hanya mampu mendegradasi glukosa setengah dari kontrol yang seharusnya, akan tetapi strain ini mampu mendegradasi lindan dan heptaklor dengan baik, karena kemampuannya sangat lemah. Diduga akibat pengaruh dari berbagai macam faktor antara kondisi medium serta tidak resisten terhadap senyawa toksikan yang tinggi.

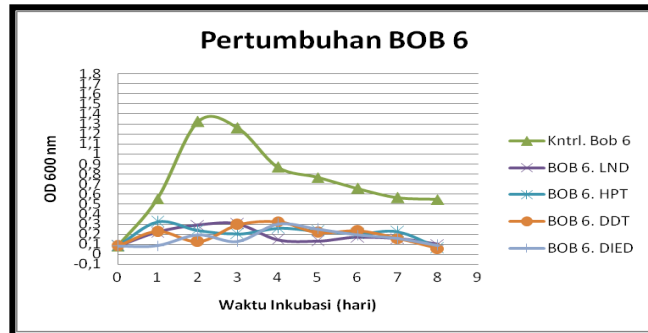


Gambar 6. Karakteristik degradasi senyawa Lindan, Heptachlor, DDT dan dieldrin oleh starin BOB 5.



Pertumbuhan Isolat BOB6

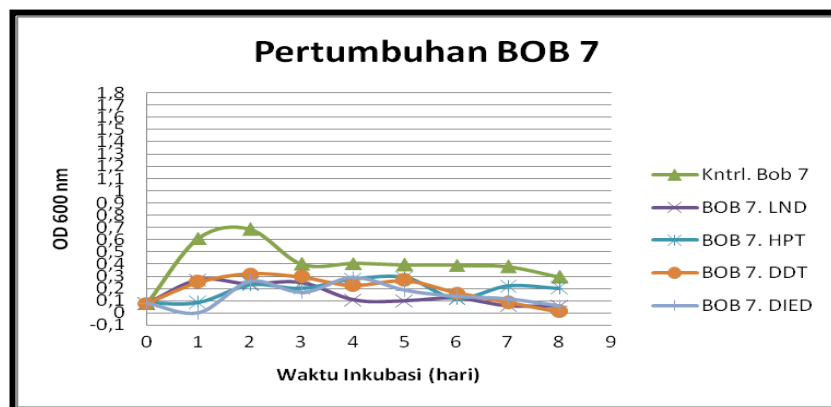
Strain BOB 6 hanya mampu mendegradasi glukosa setengah dari kontrol. Strain ini mampu mendegradasi DDT dengan baik.



Gambar 7. Karakteristik degradasi senyawa Lindan, Heptachlor, DDT dan dieldrin oleh starin BOB 6.

Pertumbuhan Isolat BOB7

Strain BOB 7 selain dapat mendegradasi glukosa setengah dari kontrol, tetapi strain ini mampu menggunakan DDT, heptaklor, dan dieldrin.



Gambar 8. Karakteristik degradasi senyawa Lindan, Heptachlor, DDT dan dieldrin oleh starin BOB 7.

Tabel 5. Kecepatan pertumbuhan (*Specific Growth Rate*) dan *Doubling time* dari berbagai macam strain yang diberi Pestisida dalam melakukan pembelahan (*/jam*)

Kode Isolat	kecepatan Pertumbuhan (μ)	Doubling Time/hour
Kntrl.BOB 1	1,881	8,84
BOB 1. LND	0,882	18,86
BOB 1. HPT	0,902	18,44
BOB 1. DDT	0,813	20,46
BOB 1. DIED	0,434	38,32

A

Kode Isolat	kecepatan Pertumbuhan (μ)	Doubling Time/hour
Kntrl. Bob 2	1,975	8,42
BOB 2. LND	0,981	16,95
BOB 2. HPT	0,833	19,97
BOB 2. DDT	0,965	17,24
BOB 2. DIED	0,655	25,39

B



Kode Isolat	kecepatan Pertumbuhan (μ)	Doubling Time/hour
Kntrl. Bob 3	1,834	9,07
BOB 3. LND	0,752	22,12
BOB 3. HPT	0,937	17,75
BOB 3. DDT	0,75	22,18
BOB 3. DIED	0,769	21,63

C

Kode Isolat	kecepatan Pertumbuhan (μ)	Doubling Time/hour
Kntrl. Bob 4	1,809	9,19
BOB 4. LND	0,983	16,92
BOB 4. HPT	0,801	20,76
BOB 4. DDT	0,75	22,18
BOB 4. DIED	0,765	21,74

D

Kode Isolat	kecepatan Pertumbuhan (μ)	Doubling Time/hour
Kontrl bob 5	1,97	8,44
BOB 5. LND	0,863	19,27
BOB 5. HPT	0,997	16,68
BOB 5. DDT	0,736	22,60
BOB 5. DIED	0,693	24,00

E

Kode Isolat	kecepatan Pertumbuhan (μ)	Doubling Time/hour
Kntrl. Bob 6	1,981	8,40
BOB 6. LND	0,961	17,31
BOB 6. HPT	0,411	40,47
BOB 6. DDT	0,691	24,07
BOB 6. DIED	0,782	21,27

F

Kode Isolat	kecepatan Pertumbuhan (μ)	Doubling Time/hour
Kntrl. Bob 7	1,842	9,03
BOB 7. LND	0,598	27,81
BOB 7. HPT	0,769	21,63
BOB 7. DDT	0,942	17,66
BOB 7. DIED	0,863	19,27

G

Keterangan: A. Isolat BOB 1, B. Isolat BOB 2, C. Isolat BOB 3, D. Isolat BOB 4, E. Isolat BOB 5, F. Isolat BOB 6, dan G. Isolat BOB 7.

Kecepatan Replikasi Isolat pendegradasi senyawa POPs

Waktu yang dibutuhkan oleh mikrobia melakukan replikasi atau disebut dengan pembelahan hal ini dapat terlihat dari hasil doubling time yang diperoleh dari masing-masing strain. Pada perlakuan kontrol waktu replikasi lebih cepat dibandingkan dengan strain yang ditumbuhkan di dalam media pestisida atau toksikan, hal ini diduga makromolekul kromosom yang dimiliki oleh mikrobia akan cepat mengalami replikasi sebab tidak ada gangguan dari senyawa lain yang akan masuk kedalam sel sehingga akan mempengaruhi kondisi didalam sel mikrobia. Sebaliknya apabila kondisi mikrobia tersebut diberikan senyawa toksikan, sebab akan mengganggu jalannya prose pembelahan, dengan kata lain mikrobia tersebut membutuhkan waktu yang terlalu lama dibandingkan dengan kontrol.

KESIMPULAN DAN SARAN

Terdapat 7 (tujuh) isolat yang mampu mendegradasi senyawa POPs, Lima isolat bersifat gram positif (BOB1, BOB2, BOB3, BOB4, BOB5) dan dua isolat bersifat gram negatif (BOB6 dan BOB7). Isolat bakteri gram positif efektif untuk mendegradasi POPs



berbahan aktif: lindan, heptaklor, DDT, dan dieldrin, sedangkan isolat gram negatif efektif untuk mendegradasi POPs berbahan aktif aldrin.

DAFTAR PUSTAKA

- Ogawa, M, 1994, Symbiosis of people and nature in the tropics: Tropical agriculture using charcoal, *Farming Japan*, 28(5) : 21-30,
- Ohsawa, K., S, Hartati, S, Nugrahati, H, Sastrohamidjoyo, K, Untung, N, Arya, K, Sumiartha dan S, Kuwatsuka, 1985, Residue analysis of organochlorin and organophosphorus pesticides in soil, water and vegetabels from central Java and Bali, *ecol./impact of IPM in Indoensia*, P, 59-70,
- PPI Deptan, 2006, Pestisida Terdaftar (Pertanian dan Kehutanan), Pusat Perijinan dan Investasi, Departemen Pertanian
- PPI Deptan, 2008, Pestisida Pertanian dan Kehutanan, Pusat Perijinan dan Investasi, Departemen Pertanian,
- PPI Deptan, 2010, Pestisida Pertanian dan Kehutanan, Pusat Perijinan dan Investasi, Departemen Pertanian,
- PPI Deptan, 2011, Pestisida Pertanian dan Kehutanan, Pusat Perijinan dan Investasi, Kementerian Pertanian.
- Soerjani, M. 1990. Trend of Pesticide Use in Indonesia and Asia Countries with Negative Impact to the Sustainable Agriculture and Enviromental Safe Agricon. pp 719-745

